LTM オーブンモジュールを用いたカラムの個別温度制御と 2 次元 GC による香水中香料アレルゲンの分析

アプリケーション

食品および香料

著者

Frank David
Research Institute for Chromatography
Pres. Kennedypark 26, B-8500 Kortrijk
Belgium

Matthew S. Klee
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

概要

EU 指令 2003/15/EC に従い、GC/MS を使用した複数の分析メソッドで原材料および化粧品に含まれる香料アレルゲンが測定されています。分析対象化合物が他の溶質と共溶出する可能性のある複雑な香水サンプルの分析には、ハートカットを組み合わせた 2 次元 GC が適しています。

本アプリケーションノートでは、Deans スイッチによるハートカットと GC/MS および低熱容量 (LTM) カラムモジュールを組み合わせた多次元キャピラリ GC メソッドを紹介します。このメソッドは、複雑なサンプルに含まれる規制対象アレルゲンの分離と定量に最適です。複数の規制対象アレルゲンを含む香水サンプルにこのメソッドを適用しました。LTM カラムモジュールを使えば、2 本目のカラムの温度を、GC オーブン内にある1 本目のカラムとは個別に制御することができます。アレルゲンを 50°C で LTM カラムにハートカットし、個別の温度プログラムで分離しました。その結果、最適な選択性が得られ、サンプルから分析対象化合物をより良好に分離することができました。

Agilent Technologies

はじめに

最近の欧州規制では、香料製品に含まれるアレルゲン化合物を監視することが義務付けられています [1]。分析対象化合物には、リモネン、シトラール、桂皮アルデヒドといった一般的な有機化合物も含まれます。こうした化合物は天然物からも検出されますが、敏感な肌では刺激を引き起こすことがあります。そのため、欧州規制では、規定の濃度 (肌に残る製品については 10 ppm、洗い流す製品については 100 ppm) を上回るアレルゲンを含む場合には、化粧品にその旨を記載することが義務付けられています。こうしたことから、複雑なマトリックスに含まれる分析対象化合物を効果的に定性および定量できるメソッドが求められています。

公式の分析対象化合物リストには、24 種類の化合物が記載されています。一部の化合物は、複数の化学的素性で構成されています。シトラールは、ネラール (Z シトラール) およびゲラニアール (E シトラール) という 2つの異性体で構成されます。リラールも 2つの異性体で構成されます (3- および 4- (4-ヒドロキシ-4-メチルペンチル)-3-シクロヘキセン-1-カルボキシアルデヒド)。ファルネソールには、少なくとも 4つの異性体が存在します。そのうちで多く存在するのは、Z,E 異性体 (ファルネソール 1) と E,E 異性体 (ファルネソール 2) です。さらに、フェニルアセトアルデヒド、エストラゴール、メチル2-ノニノエート、メチルオイゲノールといった関連する化合物もモニタリングする必要があります [2]。分析の対象化合物は、合計で 31 種類になります。化合物のリストを表 1 に、1 次元分離データを図 1 に示しています。

表 1. 分析対象アレルゲンリスト (Agilent J&W HP-5MS カラムでの溶出順)

ピーク番号	化合物
1	リモネン
2	ベンジルアルコール
3	フェニルアセトアルデヒド
4	リナロール
5	エストラゴール
6	メチル 2-オクチノエート (= フォリオン)
7	シトロネロール
8	ネラール
9	ゲラニオール
10	ゲラニアール
11	シンナムアルデヒド
12	アニシルアルコール
13	ヒドロキシシトロネラール
14	メチル 2-ノニノエート (炭酸メチルオクタン)
15	桂皮アルコール
16	オイゲノール
17	メチルオイゲノール
18	クマリン
19	イソオイゲノール
20	α イソメチルイオノン
21	リリアール (BMHCA)
22	アミルシンナムアルデヒド
23	リラール 1
24	リラール 2
25	アミルシンナミルアルコール
26	ファルネソール 1
27	ファルネソール 2
28	ヘキシルシンナムアルデヒド
29	安息香酸ベンジル
30	サリチル酸ベンジル
31	桂皮酸ベンジル

測定する化合物が含まれるマトリックスは、天然エッセンシャルオイル、香料化合物の合成混合物、天然抽出物、石鹸やジェル、シャワージェル、口紅等の化粧品といった最終製品など、多岐にわたります。さらに、そうしたマトリックスに含まれる香料化合物の濃度も、きわめて広い範囲にわたっています (高 ppb レベル～パーセントレベル)。あらゆる種類のマトリックスに含まれるすべての対象化合物を単一のメソッドで分析するのは、明らかに不可能です。そのため、各種のマトリックスを 4 クラスに分類することを提案しています [3]。各クラスについて、専用の分析メソッドを開発し、有効性を確認しました。サンプルの複雑性や分析対象化合物の濃度の多様性が高くなく、不揮発性マトリックス化合物が含まれていない場合には、希釈サンプルを直接注入し、スキャンモード [4] または選択イオンモニタリング (SIM) モードのいずれかを用いて 1 次元 GC/MS で分析するメソッドにより、無極性カラムにおいてデカン (保持指標 1000) とデコサン (保持指標 2200) の間で溶出する化合物を含むサンプルを効果的に分析できます [2]。その一例となるメソッドを、Agilent J&W HP-5MS (無極性) カラムを用いて開発しました。各種条件と対応するリテンションタイムロック情報 [5]、およびピークデコンボリューションを含む完全なアレルゲンデコンボリューションレポート作成ソフトウェア (DRS) データベースは、アジレントの Web サイト (www.agilent.com) で入手できます。

揮発性および半揮発性成分のみを含む複雑性の高いサンプル (溶質 100 種類以上) や、成分の濃度範囲がきわめて広いサンプル (たとえば、きわめて濃度の高いマトリックス成分中にきわめて濃度の低い分析対象化合物が存在する場合など) については、1 次元 GC 分離は効果的ではありません。こうしたサンプルの分析では、2次元キャピラリ GC (GC/GC、2D GC) が威力を発揮することが明らかになっています [3]。無極性 1 次カラムから極性 2 次カラムへ分析対象化合物を複数回ハートカットすれば、干渉の原因となるサンプル成分から分析対象化合物を分離することができます。これにより、1 次元 GC/MS データファイルの MS デコンボリューションが失敗した場合でも、正確な定量を行うことが可能になります。

本アプリケーションノートでは、キャピラリ・フロー・テクノロジー Deans スイッチを用いた複雑な香水サンプルの 2D GC 分析を紹介します。メソッドの柔軟性と分離能を高めるために、カラムの個別温度制御を可能にする低熱容量 (LTM) オーブンモジュールに 2 次カラムを設置しました。この構成を用いれば、温度の低い 2 次カラムに複数回のハートカット成分を集め、個別の温度プログラムで溶出することが可能です。温度プログラムは、複雑なサンプルマトリックスから分析対象化合物をもっとも効果的に分離できるように、個別に最適化することができます。

実験手法

香水サンプルはアセトンで 5 % (50 mg/mL) に希釈しました。標準溶液は純化合物からアセトン中 100 ng/µL の濃度で作成しました。

7890A GC と 5975 MSD を組み合わせて分析を行いました。GC は、SSL 注入口、FID 検出器、キャピラリ・フロー・テクノロジーを使用したDeans スイッチシステム (p/n G2855B)、PCM フローモジュール (オプション番号 309)、LTM システムコントロールバンドル (p/n G6579A) を搭載しています。

図 2 に示すように、1 次カラムを GC オーブン内に設置し、スプリット/スプリットレス注入口から Deans スイッチに接続しました。LTMカラムの入り口側を Deans スイッチに直接接続できるようにするために、LTM 用のカラムを注文する場合は「ロングリード」が必要となります。カラム出口側をカラムモジュールの近くでカットし、Agilent Ultimate Union (p/n G3182-61580) を用いて不活性化フューズドシリカ (FS) チューブで MSD に接続しました。この構成にすれば、カラムの出口側にロングリードが残っている場合よりも、条件のメソッド変換をうまく実施できます。1 m のロングリードが GC オーブン内まで延び、等温の (第 3 の) 分離ゾーンができてしまうとピークが広がり、LTM モジュールの出口における相対保持力と分離能が変化することがあるためです。Deans スイッチのもう一カ所の出口とモニター用 FID との間にリストリクタ (不活性化処理済みリテンションギャップ) を接続しました。条件を表 2 にまとめました。

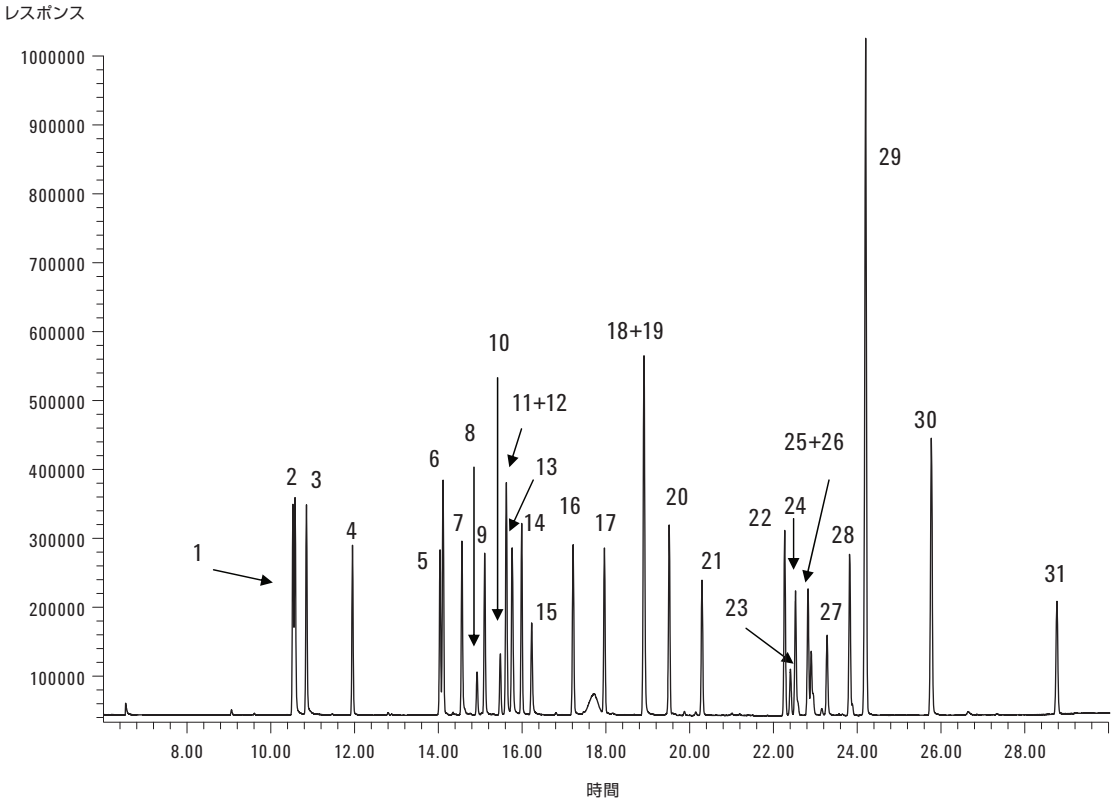

図 1.　1 次カラム (Agilent J&W HP-5MS) をFID で検出した香料アレルゲンテスト混合物の分離結果。化合物名は表 1 に示しています。

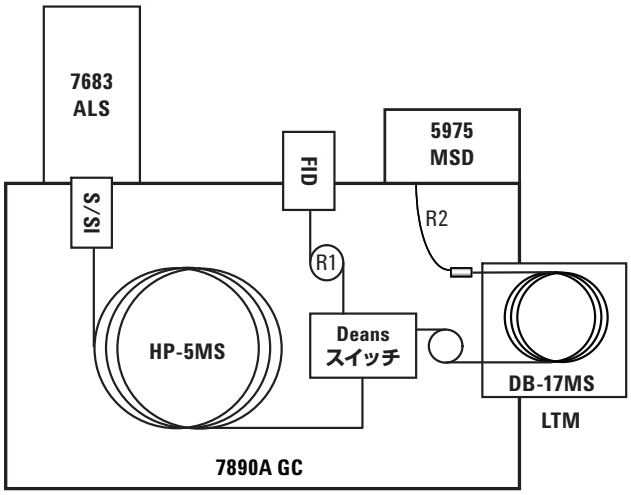

図 2.　システム構成

結果と考察

最初に、すべての分析対象化合物を濃度 100 ng/µL で含む標準混合液を分析しました。ハートカットは使用しませんでした。FID をモニター用に使用し、J&W HP-5MS カラムで分離して得られたクロマトグラムを図 1 に示しています。良好な分離結果が得られました。一部の共溶出する化合物は、DRS メソッドと同様の質量スペクトルデコンボリューション (選択イオン) により、効果的に分離できます。

次に、同じ条件を用いて香水サンプルを分析しました。FID 検出器で得られたクロマトグラムを図 3A に示しています。この図からは、香水サンプルがきわめて複雑なために、分析対象化合物の検出が困難になっていることがうかがえます。リナロール (ピーク 4) や α イソメチルイオノン (ピーク20) といった一部の化合物は、明確に分離され、検出されています。しかし、22 分から 24.5 分の間の溶出は、きわめて複雑になっています。この区間では、アミルシンナムアルデヒド、リラール (2 つの異性

表 2.　分析条件

注入量	1.0 µL
注入口	S/SI、250 °C、スプリット比 = 1:25
カラム 1 (キャリアガス = He)	30 m × 内径 0.25 mm × 0.25 µm Agilent J&W HP-5MS、p/n 19091S-433 流量 = 1.4 mL/min；コンスタントフローモード (50 °C で 185 kPa) 注入口 = SSL；出口 = PCM1
カラム 2 (LTM) (キャリアガス = He) フロー (PCM1)	30 m × 内径 0.25 mm × 0.25 µm Agilent J&W DB-17ms、p/n 122-4732LTM、 「ロングリード」付き (巻かれていないカラム部分が両端に1 m ずつ)、 第 1 の実験は 2 mL/min コンスタントフローモード (50 °C で 120 kPa)、 第 2 の実験は 120 kPa (1 分) → 256 kPa (28 分)、4.35 kPa/min
リストリクタ	R1 = 63 cm × 内径 100 µm 不活性 FS (p/n 160-1010-5 などからカット) R2 = 1 m × 内径 250 µm 不活性 FS (p/n 160-2255-1)
GC オーブン温度	50 °C (1 分) → 300 °C (27.75 分)、8 °C/min
	合計ランタイム = 60 分
LTM オーブン	50 °C (25 分、最後のハートカット後) → 250 °C (1 分)、6 °C/min (合計ランタイム= 60 分)
FID モニター検出器	300 °C、30 mL/min H_2、400 mL/min 空気
Deans スイッチハートカット	開始時 OFF Cut 1: 10.2 分で ON、11.0 分で OFF Cut 2: 15.3 分で ON、16.4 分で OFF Cut 3: 22.0 分で ON、24.5 分で OFF
MS データ取り込み	オートチューン、スキャンモード、41–300 u、サンプル = 2^2
MSD トランスファーライン	300 °C
MS 溶媒ディレイ	5 分
MS 温度	イオン源 = 300 °C、四重極 = 150 °C

体)、アミルシンナミルアルコール (関連不純物を含む)、ファルネソール (2 つの異性体)、ヘキシルシンナムアルデヒド、安息香酸ベンジルといった複数のアレルゲンが溶出します。これと同じ区間では、メチルジヒドロジャスモネート、イオノン、セスキテルペンといった干渉化合物も溶出します。こうした化合物のほとんどは、フラグメンテーションの起きやすい質量スペクトルを持っています。そのため、多くの特定されない低質量イオンが生じ、分析対象化合物のイオンスペクトルやイオン比に大きく干渉します。SIM データや DRS のデコンボリューションスキャンデータを用いた従来の選択的検出および定量は、複雑性の低いサンプルでは効果を発揮しますが、こうした複雑なサンプルでは効果的に分析できません。

このサンプルを例にとると、そうした単純なアプローチでは、リラールの有無を確認するのは困難です。GC-SIM-MS では、リラールを正確に定量することは不可能で、リラールのクオリファイアイオンは特定の範囲内に収まりませんでした。スキャンデータから、共溶出する干渉が存在することを明確に示されています。

次に、3 つのハートカットを用いてサンプルを再分析しました。分析が困難だった 22 分から 22.4 分の区間を、2 次カラムにハートカットしました。一部の香水で「安定剤」として用いられるプロピレングリコールは、リモネン、ベンジルアルコール、フェニルアセトアルデヒドを含む最初の区間で干渉要因となる可能性があります。第 2 のハートカット区間で定量および同定されるヒドロキシシトロネラールは、標準的なメソッドを用いた場合には、干渉の存在により分析が困難となることがあります。FID でモニタリングして得られたクロマトグラフを図 3B に示しています。3 つのハートカット区間は、ベースラインが平らな部分として表されています。

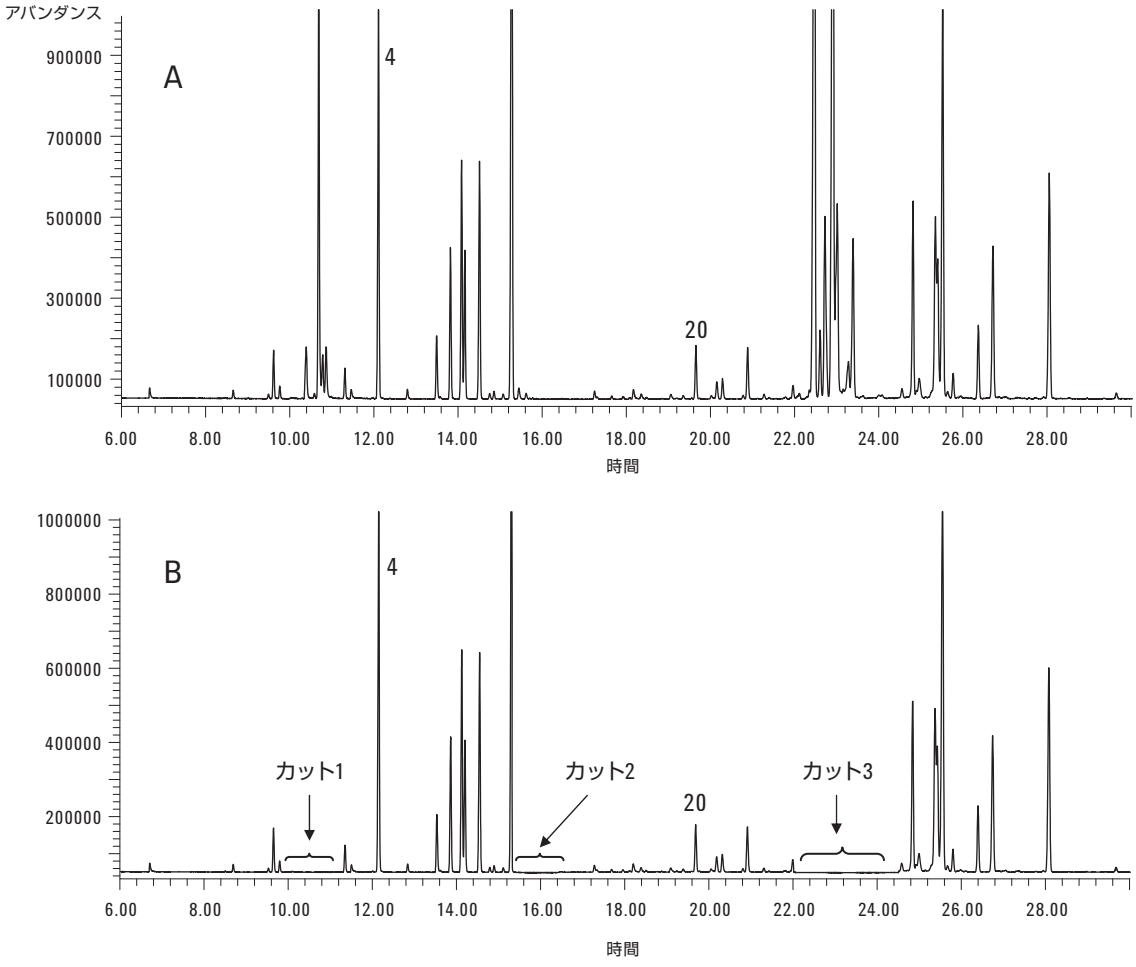

図　3. A) ハートカットを行わずに、FID 検出を用いて 1 次カラム (Agilent J&W HP-5MS) で香水サンプルを分離した結果。ピーク：4、リナロール；20、αイソメチルイオノン。B) ハートカットを行い、FID 検出を用いて 1 次カラム (Agilent J&W HP-5MS) で香水サンプルを分離した結果 (フラクション：10.2–11.0、15.3–16.4、22.0–24.5 分)。

リラールフラクション (ハートカット 3) を 2 次カラムで分離して得られた TIC を図4に示しています。はじめに、1 次カラムと同じ温度プログラムを2次カラムでも使用し (LTM プログラム = 7890A オーブンプログラム)、2 次カラムを GC オーブン内に設置した場合 (従来構成の 2D GC) の条件を再現しました。少なくとも 8 つのピークが検出されました。リラールの異性体は、25.4 分と 25.5 分に溶出します。しかし、2 つ目の異性体は他の化合物と共溶出するため、同定と定量は不可能です。本実験では、リラール異性体の溶出温度は約 240 °C でした。この温度では、保持性能と選択性はいずれも低くなります。

最後のハートカットの完了まで 2 次カラム J&W DB-17ms を 50 °C に保ってから温度を上げていく (6 °C/min) 手法を用いて、分析を再度行いました。このアプローチでは、溶質はまず LTM カラムの先端部分に集まってから、昇温中に低い温度 (200 °C) で溶出します。これにより、保持性能と選択性を効果的に利用することが可能になります。もう 1 つの利点は、フォーカシングによりピーク幅が狭まり、ピーク分離が向上することです。この条件を用いた場合、異性体は 49.25 分と 49.4 分で溶出し、干渉を受けずに定量することができます。ハートカットフラクション 3 のクロマトグラム (カラム 1 から 22～24.5 分でカット) を図 4B に示しています。図 4A とは異なり、広い濃度範囲にわたる 20 以上のピークが明確に分離されています。そのため、サンプル中のリラール異性体の存在を確認し、正確に定量することが可能になっています。

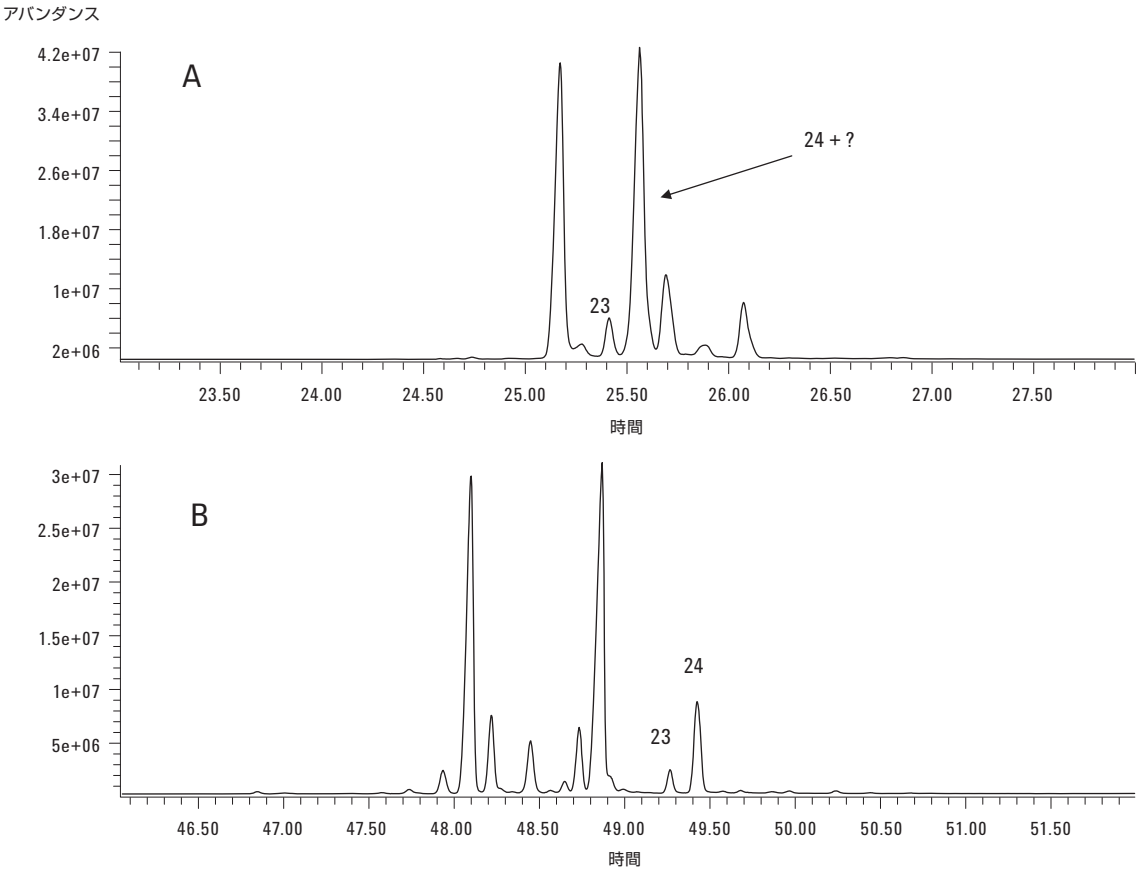

図 4. A) MS 検出を用いた 2 次カラム (Agilent J&W DB-17ms) におけるフラクション3 の分離。
カラム 1 温度 = カラム 2 温度：50 °C (1 分) → 270 °C、8 °C/min。ピーク：23、リラール 1；24、リラール 2。
B) MS 検出を用いた 2 次カラム (Agilent J&W DB-17ms) におけるフラクション 3 の分離。カラム 2 温度：50 °C (25 分) → 250 °C、6 °C/min。ピーク：23、リラール 1；24、リラール 2。

図 4 のクロマトグラムを比較すると、2D GC における 2 次カラムの個別温度制御により、選択性と分離能が大幅に向上していることがわかります。この点は、キラル 2 次カラムを用いた鏡像異性体分析でも示されています [6]。

ここで紹介した手法は、香水サンプルのほか、最終製品に含まれる香料アレルゲンの測定にも使用できます。これらのアプリケーションでは、既出のアプリケーションノートで述べられているものと同様の手法を用いれば、不揮発性のマトリックス成分や溶出の遅い成分を、バックフラッシュにより 1 次カラムから除去することが可能です [7]。

結論

Deans スイッチハートカットを用いた 2 次元 GC と MS を組み合わせれば、複雑な香水および化粧品サンプルに含まれる香料アレルゲンを測定することができます。LTM テクノロジーを使用すれば、1 次カラムとは個別に 2 次カラムの温度を制御することが可能です。これにより、選択性が向上し、マトリックス干渉から分析対象化合物をより効果的に分離することができます。LTM モジュールを追加すれば、別の GC オーブンを設置して使用する場合に比べて、コスト効率が上がり、煩雑な設定の手間が省けるほか、使用するスペースも小さくなります。

参考文献

1. Directive 2003/15/EC, Official Journal of the European Union, 6 66/26, 11.3.2003
2. A. Chaintreau, D. Joulain, C. Marin, C.-O. Schmidt, and M. Vey, J. Agric. Food Chem., 2003, 51: 6398–6403
3. F. David, C. Devos, and P. Sandra, LC.GC Europe 19, Nov 2006, 602–616
4. H. Leijs, J. Broekhans, L. van Pelt, and C. Mussinan, J. Agric. Food Chem., 2005, 53: 5487–5491
5. W. Luan, C. Sandy, and M. Szelewski, “Determination of Allergens in Fragrance Products Using Agilent Deconvolution Reporting Software,” Agilent Technologies publication 5989-8724EN, June 2008
6. F. David and M.S. Klee, 「キラル化合物の多次元分離の改善を目的としたLTM オーブンモジュールによるカラムの個別温度制御」、アジレント資料番号 5990-3428JAJP, January 2009
7. F. David and M.S. Klee, 「キャピラリカラムバックフラッシュを使用した化粧品中香料アレルゲンの分析」、アジレント資料番号 5989-6460JAJP, March 2007

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Printed in Japan
February 12, 2009
5990-3576JAJP

Agilent Technologies